

· 综述 ·

光滑念珠菌耐药机制的研究进展

徐怡澜^a, 阎 澜^{b,c} (海军军医大学: a. 基础医学院; b. 药学系军特药研究中心; c. 军事药学国家级实验教学示范中心, 上海 200433)

[摘要] 随着念珠菌病患者中感染光滑念珠菌的比例逐年增加, 光滑念珠菌已成为除白念珠菌、热带念珠菌外较为常见的致病念珠菌之一。抗光滑念珠菌的药物种类有限, 随之而来的耐药问题日益严重, 为临床治疗带来困难。本文综述了光滑念珠菌对唑类、棘白菌素类及多烯类药物的耐药机制。

[关键词] 光滑念珠菌; 唑类; 棘白菌素类; 多烯类; 耐药性

[文章编号] 2097-2024(2023)07-0393-03 **[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202202050

Research progress on drug resistance mechanism of *Candida glabrata*

XU Yilan^a, YAN Lan^{b,c} (a. School of Basic Medicine; b. Center for Drug Discovery and Development, School of pharmacy; c. National Demonstration Center for Experimental Military Pharmacy Education, Navy Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] With the increasing proportion of *Candida glabrata* in patients with candidiasis, *C. glabrata* has become one of the most common pathogenic *Candida* in clinical practice. There are limited types of antifungal drugs, and the consequent problem of drug resistance is severely increasing, which brings difficulties to clinical treatment. The resistance mechanisms of *C. glabrata* to azoles, echinocandins and polyenes were reviewed in this paper.

[Key words] *Candida glabrata*; azole; echinocandin; polyene; drug resistance

侵袭性念珠菌病(invasive candidiasis)是院内血液感染的第四大原因^[1]。由于各类疾病导致的免疫力低下病人增多, 光滑念珠菌(*Candida glabrata*)的感染率逐年递增, 引起败血症的数量也随之增加。除白念珠菌外, 光滑念珠菌已成为部分国家和地区侵袭性感染中第二常见的念珠菌种类^[2]。光滑念珠菌是一种条件致病菌, 它广泛存在于自然界, 也在人体皮肤黏膜、消化道寄生。当人体免疫功能降低或皮肤黏膜环境发生改变时, 光滑念珠菌即可大量繁殖, 引起深部脏器感染。与其他念珠菌相比, 光滑念珠菌对于抗真菌药物显著耐受^[3], 它可以在抗真菌治疗过程中迅速产生耐药性, 最终导致治疗失败^[4-5]。我国侵袭性真菌耐药监测网(CHIF-NET)2020 年统计结果显示, 临床常用抗真菌药物氟康唑和伏立康唑对光滑念珠菌的最低抑菌浓度

(MIC₉₀)分别 32 μg/ml 和 1 μg/ml。目前治疗光滑念珠菌的药物主要包括广谱三唑类、棘白菌素类以及多烯类抗真菌药。本文对光滑念珠菌的耐药机制进行综述。

1 对唑类药物的耐药机制

1.1 麦角甾醇合成通路中基因改变

针对念珠菌属使用最广泛的药物当属唑类抗真菌药物。唑类药物通过作用 14 α -去甲基化酶系统中的细胞色素 P450, 使环上氮原子与 P450 的血红素铁结合, 阻碍麦角甾醇生物合成, 同时致使其合成前体 24-甲烯二氢羊毛甾醇累积, 从而使念珠菌细胞膜损伤。麦角甾醇是保证念珠菌细胞膜稳定和流动性的重要成分, 而 *ERG11* 编码的羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶作为关键酶, 催化羊毛甾醇生成麦角甾醇。唑类药物通过结合 14 α -去甲基化酶, 阻碍催化过程, 而麦角甾醇不足最终导致细胞膜结构改变, 念珠菌增殖减少。

1.1.1 *ERG11* 基因突变

ERG11 基因突变导致唑类药物作用靶酶羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶的结构发生变化, 其与唑类药物的结合位点消失, 无法结合, 从而产生耐药性。Hull 等^[6]在临床耐药分离株中发现 *ERG11* 基因

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82173867); 上海市科技创新行动计划国际科技合作项目(21430713000); 上海市浦江人才计划(21PJD081); 上海市创新行动计划生物医药领域科技支撑项目(19431901300)

[作者简介] 徐怡澜, 临床医学专业本科学员, Email: 3163380792@qq.com

[通信作者] 阎 澜, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 抗真菌药物药效及作用机制研究, 真菌耐药机制研究, Email: ylan20001228@sina.com

G315D 突变位点, 这导致菌株对唑类药物敏感性降低。Zhang 等^[7]在念珠菌血流分离株中发现 6 株光滑念珠菌耐药株, 并在其中 2 株中检测到 *ERG11* 基因 I166S 突变位点, 其他 4 株耐药株并未出现 *ERG11* 基因的突变, 但仍能产生耐药。由此推测, *ERG11* 基因突变或许不能作为光滑念珠菌耐药的主要原因。

1.1.2 *ERG11* 基因高表达

ERG11 基因高表达导致唑类药物的靶酶生成增加, 药物无法完全抑制靶酶活性。Upc2A 和 Rpn4 是光滑念珠菌 *ERG11* 表达的关键调节因子, RPN4 与 UPC2A 的基因突变是 *ERG11* 高表达的主要原因^[8-9]。Wang 等^[10]研究 2 株耐药分离株, 其中 1 株的 *CDR1* 和 *ERG11* 高表达, 而另 1 株只有 *CDR1* 高表达, 尽管验证 *ERG11* 高表达确实会导致光滑念珠菌产生耐药, 但由于耐药株均存在 *CDR1* 高表达, 因而 *ERG11* 高表达不能作为光滑念珠菌耐药的唯一原因。

1.1.3 *AUS1* 基因高表达

当麦角甾醇生物合成在缺氧或由于甾醇合成缺陷而受到抑制时, 甾醇流入转运蛋白基因 (*AUS1* 和 *TIR3*) 和麦角甾醇生物合成通路中相关基因 (*ERG2*、*ERG3*、*ERG6* 等) 在真菌细胞中表达明显上调。在低氧条件或唑类作用下, 细胞中的 *AUS1* 表达增加, 通过输入外源性胆固醇和麦角甾醇, 可使光滑念珠菌得以存活^[11]。

1.2 药物外排增强

与其他念珠菌不同, 光滑念珠菌细胞膜上与耐药性相关的外排泵主要是 ABC 转运蛋白家族 (由念珠菌耐药性 *CDR1*、*CDR2*、*SNQ2* 基因编码), 这类外排泵通过水解 ATP 获得能量, 并通过细胞膜主动外排药物。

1.2.1 ABC 转运蛋白家族表达增加

CDR1、*CDR2* 及 *SNQ2* 基因高表达导致光滑念珠菌内药物被快速排出, 从而对唑类药物产生耐药性。Zhang 等^[6]在念珠菌血流分离株中发现, 光滑念珠菌耐药分离株的 *CDR1*、*CDR2* 基因表达显著增加。Wang 等^[10]研究两株耐药分离株, 发现 *CDR1* 基因均高表达。有研究发现^[12], *CDR1*、*CDR2* 在 16 种耐药分离株中分别有 12 及 8 株高表达, 且其中有 4 株耐药株 *CDR1*、*CDR2* 同时高表达; 而有 8 株耐药株 *SNQ2* 表达仅相对升高, 这可能说明 *SNQ2* 没有单独表达或并非主要外排泵, 表明这些 ABC 转运蛋白之间可能存在相互作用。

1.2.2 *PDR1* 基因突变

PDR1 是 ABC 转运蛋白家族的上游调节基

因。研究发现, *Pdr1* 和 *Pdr3* 是酿酒酵母中两种密切相关的蛋白同系物, 作用与光滑念珠菌中的 *Pdr1* 相似。Yao^[13]等在耐药菌株中发现 *PDR1* 中的新错义突变位点 A848V。Khakhina^[14]等发现光滑念珠菌 *PDR1* 的作用是酿酒酵母 *PDR1* 和 *PDR3* 自调节转录作用的结合, *PDR1* 自调节在光滑念珠菌耐药性产生中起重要作用。*PDR1* 基因的功能获得性突变 (GOF), 会导致 *CDR1* 表达上调。Hou^[15]等对 *PDR1* 多态性进行研究, 发现唑类耐药分离株的 *PDR1* 多态性比率 (14 个中的 13 个, 92.9%) 明显高于唑类敏感分离株 (144 个中的 28 个, 19.4%)。

1.3 DNA 错配修复系统缺陷

真菌耐药性产生大多缘于基因突变。DNA 错配修复 (MMR) 系统纠正 DNA 聚合酶在 DNA 复制过程中产生的错误, 以及修复由环境因素或内源性因素引起的 DNA 损伤。*MSH2* 为该修复系统的关键基因之一。

Healey^[16]等发现有 55% 携带 *MSH2* 功能丧失的突变 (LOF), 导致体外和体内抗真菌药物耐药性的加速出现, 这些突变在氟康唑处理后更为常见。但也有研究表明 *MSH2* 序列与氟康唑耐药性或基因型增加之间无明确关联, 在这些研究中 *MSH2* 被认为是光滑念珠菌的管家基因, 即该基因的多态性可能与遗传复合物的差异有关, 而与抗真菌药物耐药性不直接相关^[15,17]。尽管如此, 不能否认 *MSH2* 功能丧失的突变引起错误的不匹配修复, 进而参与真菌耐药性的发展, 其相关性仍有待进一步研究。

2 对棘白菌素类药物的耐药机制

β -葡聚糖是念珠菌细胞壁的基本成分, 棘白菌素类药物通过抑制 β -1,3-葡聚糖的合成, 对念珠菌属发挥杀真菌活性。

多项研究表明, *FKS* 基因突变导致其结合位点改变是棘白菌素耐药性产生的主要原因。Wang^[10]等研究 2 株耐药分离株, 对 *FKS* 测序显示, 2 种分离株在 *FKS2* 中都含有 S663P 突变且存在 4 个单核苷酸多态性 (SNP), 而 *FKS1* 则无突变。同时, *FKS1* 和 *FKS2* 的表达均上调。Al-Baqsmi^[18]等在 5 种耐米卡芬净的分离株中, 发现 4 株分离株 *FKS2* 含有非同义 (S663P) 突变, 1 株分离株含有 *FKS2* 热点 -1 (HS1) 中的三核苷酸缺失 (对应于 F659; Δ F659)。Pham^[19]等在 1037 株耐棘白菌素光滑念珠菌中进行 *FKS* 测序, 检测出 47 株具有 *FKS* 突变。其中, 检测出 12 种独特的突变: *FKS1* 中的 5 种 (15 株) 和 *FKS2* 中的 7 种 (35 株)。所有

突变都发生在 HS1 中, 没有检测到 HS2 突变。通过以上研究结果, 可推测影响光滑念珠菌对棘白菌素易感性的大多数突变位于 *FKS1* HS1 和 *FKS2* HS1 区域, 且 *FKS2* 的突变多于 *FKS1*。

3 对多烯类药物的耐药机制

多烯类药物是广泛运用于临床的抗真菌感染的广谱抗菌药。两性霉素 B 是多烯类的代表药物, 通过结合念珠菌细胞膜上的麦角甾醇, 形成孔道, 以改变念珠菌细胞膜通透性从而使念珠菌死亡。

3.1 自身合成替代甾醇

真菌能够自身合成甾醇中间体完成代谢, 但麦角甾醇缺乏, 导致两性霉素 B 无作用靶点。Hull 等^[6]在多种临床耐药分离株中发现 CG156 分离株内仅可检测到 14 α -甲基化甾醇中间体这一种甾醇, 即这种分离株内缺乏麦角甾醇, 但该耐药株仍可以在没有外源性供应甾醇的情况下, 用 14 α -甲基化甾醇中间体合成细胞所需的甾醇。

3.2 麦角甾醇生物合成基因突变

由 *ERG6* 中密码子 Tyr192、Trp286 或 Leu341 无义突变导致 Erg6 蛋白的过早终止; 由 *ERG2* 中含有的 G122S 和 G119S 无义突变导致 Erg2 蛋白功能受损, 最终均导致突变株细胞膜缺乏麦角甾醇, 进而破坏细胞膜通透性和流动性^[20-23]。

4 小结

综上所述, 光滑念珠菌作为临床上较为重要的致病菌之一, 由于抗真菌药物种类有限, 临床应用重复率高, 导致的耐药问题日益严重。因此, 一方面需要临床合理用药、联合用药, 尽量避免耐药性的产生; 另一方面, 需要研发新型抗真菌药物。有研究表明^[24-28], 阿魏酸与卡泊芬净, 薄荷醇、百里酚、替加环素、绒毛钩藤不溶性成分与唑类药物的协同作用, 通过损伤念珠菌生物被膜等方式, 可以有效降低唑类耐药菌的 MIC。也有研究开辟新的思路, 寻找新的药物靶点: 合成的铋纳米颗粒可以潜在地用于改善氧化应激和各种微生物感染, 对念珠菌病病例有强大抗真菌能力^[29]; 4 种双鸟苷衍生物(BG1-BG4)对光滑念珠菌和白念珠菌的 MIC 在 2 ~ 15.6 $\mu\text{g/ml}$ 之间, 其中 BG3 作用于 DNA, 扰乱复制转录过程, 导致在细胞质膜外层的磷脂酰丝氨酸暴露, 半胱氨酸蛋白酶活化, 促进真菌细胞凋亡^[30]。药物研发和探索是漫长的过程, 需要一代代人的验证和实践, 但可以预见, 在不久的将来, 这些药物最终会有一部分应用于临床实践中, 为缓解临床耐药问题提供新的选择。

【参考文献】

- [1] GRABOWSKI R, DUGAN E. Disseminated candidiasis in a patient with acute myelogenous leukemia[J]. *Cutis*, 2003, 71(6): 466-468.
- [2] ARASTEHFAR A, LASS-FLÖRL C, GARCIA-RUBIO R, et al. The quiet and underappreciated rise of drug-resistant invasive fungal pathogens[J]. *JoF*, 2020, 6(3): 138.
- [3] HEALEY K R, PERLIN D S. Fungal resistance to echinocandins and the MDR phenomenon in *Candida glabrata*[J]. *J Fungi (Basel)*, 2018, 4(3): 105.
- [4] GROSSET M, DESNOS-OLLIVIER M, GODET C, et al. Recurrent episodes of Candidemia due to *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* and *Candida albicans* with acquired echinocandin resistance[J]. *Med Mycol Case Rep*, 2016, 14: 20-23.
- [5] WON E J, CHOI M J, KIM M N, et al. Fluconazole-resistant *Candida glabrata* bloodstream isolates, south Korea, 2008-2018[J]. *Emerg Infect Dis*, 2021, 27(3): 779-788.
- [6] HULL C M, PARKER J E, BADER O, et al. Facultative sterol uptake in an ergosterol-deficient clinical isolate of *Candida glabrata* harboring a missense mutation in *ERG11* and exhibiting cross-resistance to azoles and amphotericin B[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(8): 4223-4232.
- [7] TEO J Q M, LEE S J Y, TAN A L, et al. Molecular mechanisms of azole resistance in *Candida* bloodstream isolates[J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1): 63.
- [8] PAIS P, CALIFÓRNA R, GALOCHA M, et al. *Candida glabrata* transcription factor Rpn4 mediates fluconazole resistance through regulation of ergosterol biosynthesis and plasma membrane permeability[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 64(9): e00554-e00520.
- [9] VU B G, STAMNES M A, LI Y, et al. The *Candida glabrata* Upc2A transcription factor is a global regulator of antifungal drug resistance pathways[J]. *PLoS Genet*, 2021, 17(9): e1009582.
- [10] WANG Q Q, LI Y, CAI X, et al. Two sequential clinical isolates of *Candida glabrata* with multidrug-resistance to posaconazole and echinocandins[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2021, 10(10): 1217.
- [11] LI Q Q, TSAI H F, MANDAL A, et al. Sterol uptake and sterol biosynthesis act coordinately to mediate antifungal resistance in *Candida glabrata* under azole and hypoxic stress[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 6585-6597.
- [12] WHALEY S G, ZHANG Q, CAUDLE K E, et al. Relative contribution of the ABC transporters Cdr1, Pdh1, and Snq2 to azole resistance in *Candida glabrata*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(10): e01070-e01018.
- [13] YAO D T, CHEN J, CHEN W Q, et al. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* from two hospitals in China[J]. *Infect Drug Resist*, 2019, 12: 771-781.
- [14] KHAKHINA S, SIMONICOVA L, MOYE-ROWLEY W S. Positive autoregulation and repression of transactivation are key regulatory features of the *Candida glabrata* Pdr1 transcription factor[J]. *Mol Microbiol*, 2018, 107(6): 747-764.
- [15] HOU X, XIAO M, WANG H, et al. Profiling of PDR1 and MSH2 in *Candida glabrata* bloodstream isolates from a multicenter study in China[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(6): e00153-e00118.

(下转第 432 页)

的要求^[7],说明中药材规范化种植和管理的重要性。动物类药材养殖往往较植物类药材的种植更具复杂性。本课题组数年来对沪地龙的养殖不断的进行探索,在此基础上提出了沪地龙规范养殖的新方法,为解决沪地龙规模化和可持续的人工养殖、缓解沪地龙的资源紧缺提供了可行的途径。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 127.
- [2] 刘思娜, 连妍洁, 仇盛蕾, 等. 基于数据挖掘具有脑心同治功效的中成药配伍规律研究 [J]. 世界中医药, 2022, 17(13): 1928-1933, 1938.
- [3] 黄辛迪, 丁长松, 苏啟后, 等. 基于数据挖掘的缺血性中风中医处方用药规律研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2022, 43(1): 23-28.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 1995 年版一部 [S]. 广州: 广东科技出版社, 1995: 98.
- [5] 鞠春梅, 刘玲, 尹馨雪, 等. 《中国药典》2020 年版环节动物门

药用动物养殖研究进展 [J]. 中国现代中药, 2022, 24(9): 1612-1617.

- [6] 格小光, 蒋超, 田娜, 等. 基于 DNA 测序技术的市售地龙类药材基原调查与考证研究 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(9): 1206-1214.
- [7] 国家药品监督管理局、农业农村部、国家林草局、国家中医药局. 《中药材生产质量管理规范 (GAP)》[EB/OL]. 北京, 2022: 3, 7.
- [8] 任德权, 周荣汉. 中药材生产质量管理规范 (GAP) 实施指南 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [9] 蒋际宝, 邱江平. 中国巨蚓科蚯蚓的起源与演化 [J]. 生物多样性, 2018, 26(10): 1074-1082.
- [10] 孙静, 蒋际宝, 张林, 等. 3 个采集于中国云南的远盲蚓属新物种 (单向蚓目: 巨蚓科)[J]. 四川动物, 2021, 40(5): 550-557.
- [11] 陈义. 中国动物图谱——环节动物 (附多足类)[M]. 北京: 科学出版社, 1959.
- [12] 江胜国. 国内土壤容重测定方法综述 [J]. 湖北农业科学, 2019, 58(S2): 82-86, 91.

【收稿日期】 2022-07-31 【修回日期】 2023-04-07

【本文编辑】 李睿旻

(上接第 395 页)

- [16] HEALEY K R, ZHAO Y N, PEREZ W B, et al. Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen *Candida glabrata* promotes multi-drug resistance[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11128.
- [17] BORDALLO-CARDONA M Á, AGNELLI C, GÓMEZ-NUÑEZ A, et al. *MSH2* gene point mutations are not antifungal resistance markers in *Candida glabrata*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 63(1): e01876-e01818.
- [18] AL-BAQSAMI Z F, AHMAD S, KHAN Z. Antifungal drug susceptibility, molecular basis of resistance to echinocandins and molecular epidemiology of fluconazole resistance among clinical *Candida glabrata* isolates in Kuwait[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 6238.
- [19] PHAM C D, IQBAL N, BOLDEN C B, et al. Role of FKS mutations in *Candida glabrata*: MIC values, echinocandin resistance, and multidrug resistance[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(8): 4690-4696.
- [20] BELENKY P, CAMACHO D, COLLINS J J. Fungicidal drugs induce a common oxidative-damage cellular death pathway[J]. *Cell Rep*, 2013, 3(2): 350-358.
- [21] AHMAD S, JOSEPH L, PARKER J E, et al. *ERG6* and *ERG2* are major targets conferring reduced susceptibility to amphotericin B in clinical *Candida glabrata* isolates in Kuwait[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(2): e01900-e01918.
- [22] VANDEPUTTE P, TRONCHIN G, BERGÈS T, et al. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the *ERG6* gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(3): 982-990.
- [23] VANDEPUTTE P, TRONCHIN G, LARCHER G, et al. A non-sense mutation in the *ERG6* gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*[J]. *Anti-*

microb Agents Chemother, 2008, 52(10): 3701-3709.

- [24] CANTURK Z. Evaluation of synergistic anticandidal and apoptotic effects of ferulic acid and caspofungin against *Candida albicans*[J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(1): 439-443.
- [25] SHARIFZADEH A, KHOSRAVI A R, SHOKRI H, et al. Synergistic anticandidal activity of menthol in combination with itraconazole and nystatin against clinical *Candida glabrata* and *Candida krusei* isolates[J]. *Microb Pathog*, 2017, 107: 390-396.
- [26] SHARIFZADEH A, KHOSRAVI A R, SHOKRI H, et al. Potential effect of 2-isopropyl-5-methylphenol (thymol) alone and in combination with fluconazole against clinical isolates of *Candida albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei*[J]. *J De Mycol Médicale*, 2018, 28(2): 294-299.
- [27] HOOPER R W, ASHCRAFT D S, PANKEY G A. *In vitro* synergy with fluconazole plus doxycycline or tigecycline against clinical *Candida glabrata* isolates[J]. *Med Mycol*, 2019, 57(1): 122-126.
- [28] MORAES R C, CARVALHO A R, DALLA LANA A J, et al. *In vitro* synergism of a water insoluble fraction of *Uncaria tomentosa* combined with fluconazole and terbinafine against resistant non-*Candida albicans* isolates[J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 406-415.
- [29] DAS P E, MAJDALAWIEH A F, ABU-YOUSEF I A, et al. Use of A hydroalcoholic extract of *Moringa oleifera* leaves for the green synthesis of bismuth nanoparticles and evaluation of their anti-microbial and antioxidant activities[J]. *Materials (Basel)*, 2020, 13(4): 876.
- [30] LAZIĆ J, AJDAČIĆ V, VOJNOVIĆ S, et al. Bis-guanyldrazones as efficient anti-*Candida* compounds through DNA interaction[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(4): 1889-1901.

【收稿日期】 2022-02-21 【修回日期】 2022-07-11

【本文编辑】 崔俐俊